



UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA
TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



COURS DE BIOTECHNOLOGIES ET APPLICATIONS *2^{ÈME} ANNÉE LICENCE BS*

Présentée par:
Dr Radia Chemlal

2022-2023

CHAPITRE 5
APPLICATION DES
BIOTECHNOLOGIES DANS
LE DOMAINE MÉDICAL ET
ANIMAL

- ▣ *Aperçu historique du développement des cultures in vitro.*
- ▣ *Totipotence.*
- ▣ *Culture in vitro et son utilisation.*
- ▣ *Les biotechnologie de l'embryon.*
- ▣ *Culture cellulaire animale pour des productions industrielles.*

Introduction

La culture cellulaire est un des outils de choix au laboratoire. Qu'il s'agisse de recherche fondamentale ou d'applications biotechnologiques, elle permet aujourd'hui de disposer facilement et rapidement de matériel biologique. En maîtrisant les paramètres physico-chimiques des conditions de culture et de traçabilité des cellules, la culture in vitro permet d'effectuer des expériences standardisées.

***APERÇU HISTORIQUE DU
DÉVELOPPEMENT DES
CULTURES IN VITRO***

- ▣ 1870, Premières tentatives de culture d'organes vivants isolés (conservation de queues de têtards de grenouille).
- ▣ 1902, Haberlandt, chercheur allemand, énonce le concept de la totipotence cellulaire végétale. Il réussit à faire survivre *in vitro*, quelques mois, de petits amas cellulaires mais sans multiplication.
- ▣ 1907, croissance de fibre nerveuse de grenouille *in vitro*.
- ▣ 1912, Carrel réussissait la culture indéfinie de cellules de cœur d'embryon de poulet par repiquages successifs.
- ▣ 1916, Détachement par la trypsine et sous-culture d'explants.
- ▣ 1929, culture d'organe d'os longs de poulet.
- ▣ 1948, introduction des ATBs dans une culture de tissu.
- ▣ 1952, production de vaccin par Salk contre la polio, dans des cellules de rein de singe.
- ▣ 1952, première lignée humaine, Hela, à partir d'un carcinome du col de l'utérus.
- ▣ 1970, développement de hottes à flux laminaire.
- ▣ 1975, les anticorps monoclonaux.

D'après les dates, trois périodes vont marquer le développement de la culture cellulaire :

- **La période des précurseurs**: Cette période annonce la première méthode de culture de tissu en dehors du corps, grâce au Professeur Harrison qui a pu cultiver des neuroblastes de grenouille dans un milieu de lymphe et ainsi franchit un premier pas vers la recherche actuelle sur les cellules souches et dérivées.
- **La période de la culture de tissus**: Cette période est dominée par Carrel qui oriente le développement de la culture de tissus suivant 3 voies principales :
 - L'amélioration des techniques d'obtention des tissus.
 - L'élaboration des règles d'aseptie.
 - L'étude des besoins nutritionnels. Il est le père de la culture cellulaire : il a imaginé, inventé et mis au point les premières cultures cellulaires. CARREL à cultiver un cœur de poulet battant in vitro plus longtemps que la vie du poulet.
- **La culture cellulaire** n'apparaît, à proprement dit, qu'à partir de 1952 lors de l'introduction de la trypsination des tissus par Moscona en 1952. Il procède à la digestion de tissu d'oeuf de poulet avec de la trypsine afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser in-vitro.

Totipotence

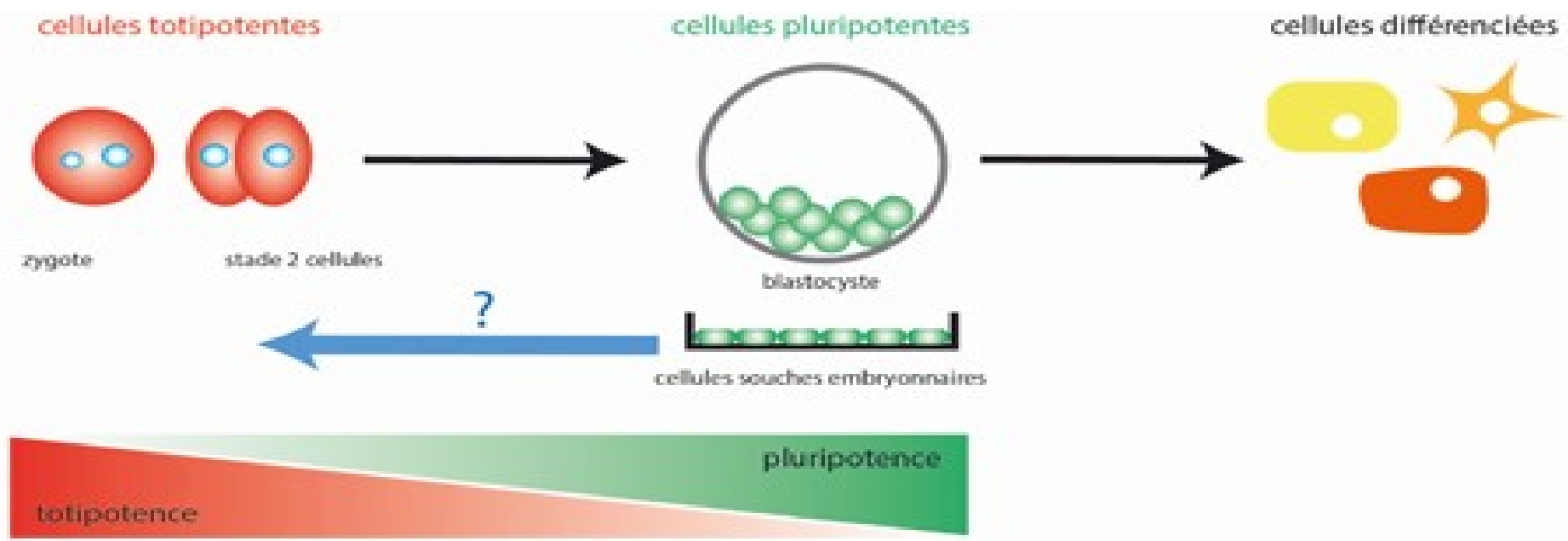
Définition

La totipotence d'une cellule est sa capacité à générer de façon autonome un organisme complet en se divisant et donnant tous les tissus y compris la lignée germinale et les tissus extra-embryonnaires, cette notion est limitée aux seules cellules présentes dans les premiers stades de développement (les cellules souches totipotentes sont à l'origine de la formation de l'embryon et de ses annexes extra-embryonnaires, dont le placenta).

Chez l'Homme, **les cellules totipotentes (cellule indifférencier)** sont présentes au niveau du zygote au stade de 2 cellules (2C-like cells) et au maximum jusqu'au 4e jour après la fécondation. À partir du cinquième jour, il se forme, dans le blastocyste, un bourgeonnement cellulaire contenant des cellules souches pluripotentes. Une fois isolées, ces cellules sont capables de générer tous les tissus de l'embryon (mésoderme, endoderme et ectoderme) et on parle alors des **cellules différenciées (voir Fig.1.)**; cependant, elles ne peuvent plus donner naissance à un embryon car elles ont perdu la capacité de former les annexes extra-embryonnaires. C'est à partir de ces **cellules pluripotentes** que sont obtenues **les cellules souches embryonnaires** (dites cellules ES pour embryonic stem cells) utilisées au laboratoire.

La totipotence est donc un état beaucoup plus plastique que la pluripotence. La compréhension de la plasticité des cellules totipotentes a ouvert la voie à l'approche de clonage nucléaire ou le transfert nucléaire somatique. Démonstré pour la première fois chez les mammifères en 1996 avec le clonage du mouton Dolly. Cette méthodologie consiste à transférer le noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé.

Avec l'identification des cellules souches embryonnaires humaines et la maîtrise des techniques de transfert nucléaire, il est devenu possible d'utiliser les cellules souches embryonnaires dans la thérapie régénérative. Ces approches se heurtent à de nombreux obstacles tant scientifiques et techniques qu'éthiques.



<https://presse.inserm.fr/de-la-pluripotence-a-la-totipotence/20082/>

Culture in vitro et son utilisation

Culture de cellules animale: ce sont des cultures in vitro de cellules, de tissus et d'organe dans un milieu artificiel. Des techniques permettant de **faire croître des cellules *ex-vivo*** (hors de leur organisme), c'est à dire, de composition connue et sans variation dues au métabolisme. Ces techniques récentes sont liées au développement des biotechnologies.

Ces techniques sont délicates car les cellules animales sont fragiles (sans paroi) et malgré les conditions stériles lors de la manipulation, les contamination sont fréquentes (bactéries, champignons et surtout levure).

On distingue 2 types de cellules dans l'organisme :

- les cellules circulantes ou libres, telles que les cellules sanguines qui sont récupérées par centrifugation.

- les cellules des tissus solides récupérées selon 2 procédés :

- migration cellulaires à partir d'explant.

- dissociation du tissu avec libération des cellules.

La culture de cellules obtenues à partir d'organe ou de tissu est appelée primoculture ou culture primaire.

Terminologie en Culture Cellulaire

Explants: fragments excisés d'un tissu ou d'un organe utilisés pour initier une culture *in vitro*.

Culture en suspension: type de culture permettant à des cellules de se multiplier alors qu'elles sont en suspension dans un bouillon.

Culture primaire: culture initiée à partir de cellules, de tissus ou d'organes prélevés directement sur un organisme. De telles cultures peuvent être considérées comme primaires jusqu'au premier repiquage. Elle devient alors une lignée cellulaire.

Lignée cellulaire: une lignée cellulaire provient d'une culture primaire au moment du premier repiquage. L'expression "lignée cellulaire" signifie que les cultures qui en proviennent se composent de nombreux lignages de cellules qui étaient présentes à l'origine dans la culture primaire.

Les lignées cellulaires sont des cellules « immortelles » car :

- *Elles peuvent être cancéreuses.
- *Elles peuvent être contaminées par un virus qui les rend immortelles (virus de l'Herpès ou SV40).
Exemple: des cellules primaire immortalisée avec un virus herpès et production de lignée cellulaire.
- *Elles peuvent être modifiées par le génie génétique ; en injectant le gène codant pour la protéine rendant immortel (comme le gène T du virus SV40).

Cellules souches embryonnaires : ce sont des cellules souches pluripotente issue de la masse cellulaire interne de de l'embryon. Les cellules souches embryonnaire peuvent ainsi engendrer tous les types cellulaires de l'organisme, leur utilisation a donné naissance à de nombreuses applications dans la biotechnologie et le médical.

- ▣ On distingue également 2 types de culture :
- ▣ La **culture 2D** qui permet de cultiver les cellules sous forme de tapis cellulaire, cette méthode présente de nombreux avantages comme la facilité de manipulation mais elles présentent également des désavantages comme notamment le manque de similitude avec les conditions in vivo
- ▣ La **culture 3D** est de plus en plus utilisée car elle permet de cultiver les cellules dans des conditions qui imitent l'environnement des cellules in vivo. Elle permet donc d'obtenir des cellules avec une morphologie proche de ce qu'elles ont dans l'organisme (ex: organoïdes et sphéroïdes).

INTÉRÊTS DE LA CULTURE CELLULAIRE

Elles ont pour but d'étudier des phénomènes physiologiques, des mécanismes biochimiques sans avoir recours à l'expérimentation in vivo.

Exemples d'application :

-Etude du mécanisme d'infection par un virus tel que le HIV.

-Etude de la différenciation cellulaires et des mécanismes des cancers.

-Pharmacotoxicologie: test de substances pharmacologiquement active sur des cellules. Les modèles cellulaires apparaissent comme alternative notamment en raison des problèmes d'expérimentation animale, expérimentation animale qui ne peut malgré tout pas être supprimée car les effets sur l'animal entier ne sont pas les mêmes que sur des cellules isolées.

Biotechnologie: production de substances par les cellules, telle que l'insuline et les hormones de croissance.

-Production des anticorps monoclonaux.

-Culture des virus (production de vaccin ou diagnostic direct ou indirect des viroses).

-Production de peau neuve par culture pour autogreffe ultérieure (pour les grands brûlés).

Culture cellulaire animale pour la production industrielle

La culture de cellules animales permet la production de nombreuses molécules thérapeutiques telles que des vaccins et des protéines recombinantes.

En 1982, l'insuline humaine, développée par Genentech et produite par Eli Lilly & Co, a été la première protéine recombinante à obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour un usage thérapeutique, AMM délivrée par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicaux (FDA) et l'agence européenne du médicament (EMA).

Actuellement, 907 molécules thérapeutiques issues de la biotechnologie sont en phase de développement aux Etats-Unis. Ainsi, les médicaments issus des biotechnologies génèrent un chiffre d'affaire annuel de l'ordre de 140 milliards de dollars .

Ces médicaments sont principalement des protéines recombinantes impliquées dans les traitements du cancer, du diabète, du retard de croissance, de l'hémophilie, des hépatites et autres maladies auto-immunes. La majorité de ces médicaments est destinée à un usage thérapeutique, seule une faible proportion de ceux-ci est utilisée pour le diagnostic.

La majorité des protéines recombinantes pharmaceutiques sont produites dans des cellules animales dont 60 à 70% dans les cellules de mammifères. L'un des principaux avantages des cellules animales réside dans leur capacité à réaliser les modifications post-traductionnelles, dont la glycosylation, au cours de la synthèse de protéines recombinantes. L'état de glycosylation est important pour de nombreuses propriétés de la protéine: pharmacocinétique, bioactivité, sécrétion, solubilité, antigénicité...

La maîtrise des cultures de cellules animales pour produire des substances bioactives constitue un enjeu thérapeutique majeur qui génère des revenus importants.

***PRODUCTION DES
ANTICORPS MONOCLONAUX***

Définition

Les anticorps **dits « monoclonaux »** sont des anticorps fabriqués par des cellules en culture pour traiter des maladies spécifiques. Plus de 30 anticorps monoclonaux sont commercialisés en France aujourd'hui dans le traitement de maladies inflammatoires chroniques (telles que la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, etc.), de cancers et du rejet de greffe. Ils ont révolutionné la prise en charge de nombreuses maladies.

Historique

C'est en 1975 que Köhler et Milstein produisent les premiers anticorps monoclonaux en utilisant une méthode qui est devenue rapidement l'une des technologies clés de l'immunologie. En fusionnant des lymphocytes B activés avec des cellules de myélome, ils ont été capables de former des cellules hybrides - appelées hybridomes - qui conservent les propriétés sécrétrices d'anticorps des cellules B activées et celles d'immortalité des cellules de myélome. Sélectionnés et clonés, ces hybridomes constituent une source théoriquement illimitée d'anticorps spécifiques, tous identiques.

Ces anticorps ont d'abord trouvé de nombreuses applications au niveau de la recherche fondamentale et du diagnostic in vitro. Dans le laboratoire de Biologie clinique, les anticorps monoclonaux sont utilisés comme réactifs dans les immunodosages. De nombreuses années de développement et d'innovation ont été nécessaires pour humaniser les anticorps monoclonaux, afin de les rendre utilisables en thérapeutique humaine.

Production d'anticorps monoclonaux in vitro

La production d'anticorps monoclonaux *in vitro* se fait en quatre étapes.

La première est généralement effectuée en animalerie, alors que les trois autres sont réalisées dans un laboratoire de culture cellulaire. La fig.2. résume le processus.

Ce processus comprend plusieurs étapes:

- Immunisation d'un animal (production in-vivo).
- Des cellules de la rate sont prélevées et sont fusionnées à des cellules myélomateuses.
- Les hybridomes sont sélectionnés par incubation dans un milieu HAT qui ne permet la croissance que des cellules possédant le gène fonctionnel HPGRT provenant de l'ADN des lymphocytes B.

• Une étape de clonage par dilution conduit au choix des cellules produisant l'anticorps monoclonal désiré en quantité suffisante. Les clones positifs sont multipliés à petite ou à grande échelle selon les besoins.

Dans l'exemple illustré, les hybridomes sélectionnés sont cultivés à grande échelle dans un bioréacteur à perfusion, dans lequel les cellules sont maintenues immobilisées alors que le milieu de culture circule en continu. De cette façon, les anticorps sécrétés peuvent être récoltés continuellement

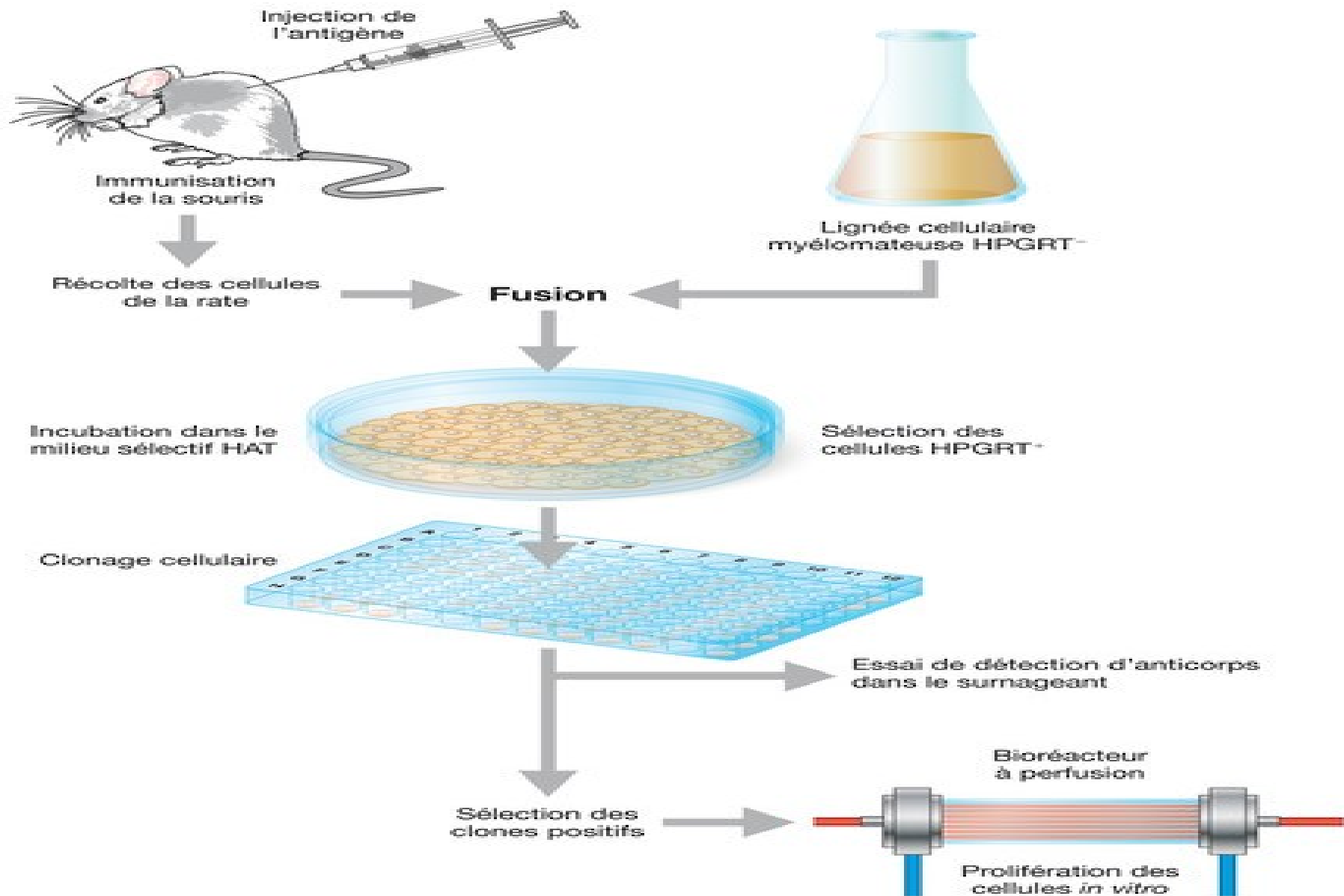


Fig.2. La production d'anticorps monoclonaux *in vitro*.

([https://monde.ccdmd.gc.ca/ressource/?id=121401&demande=d](https://monde.ccdmd.gc.ca/ressource/?id=121401&demande=desc)
[esc](#)).

Référence et webographie

- Barlovatz-Meimon, G et Ronot, X (2014). *Culture de cellules animales*, 3^{ème} édition. Inserm, Lavoisier TEC et DOC, 667p.
- Mistretta, V.I., Cavalier, E., Collette, J., Chapelle, J.P., (2009). **Production des anticorps monoclonaux.** Rev Med Liège; 64 : 5-6 : 248-252.
[https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/16653/1/4.%20MISTRETTA%20Prod%20Ac%20\(5\).pdf](https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/16653/1/4.%20MISTRETTA%20Prod%20Ac%20(5).pdf).
- Brou, M (2014). **Culture de cellules animales dans l'industrie pharmaceutique: production de protéines thérapeutiques d'une petite échelle a une echelle industrielle.** Thèse de doctorat en pharmacie. (CC BY-NC-ND 2.0). UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1 FACULTE DE PHARMACIE INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES.
- Ishiuchi T, et coll (2015). *Nature Structural & Molecular Biology*, 22, 662-671 (2015) doi:10.1038/nsemb.3066. In :REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - DÉCEMBRE 2015 - N°477.
- <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>. <http://portaildoc.univ-lyon1.fr/>.
- <https://www.vidal.fr/medicaments/utilisation/biotherapie-biosimilaire/anticorps-monoclonaux.html>.
- <https://monde.ccdmd.gc.ca/ressource/?id=121401&demande=desc>.
- <https://www.clinisciences.com/lire/culture-cellulaire-1191.html>.
- <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/bcm/TP/CultureCellulaireAnimale.pdf>.
- <https://bdevalrose.fr/wp-content/uploads/2020/09/Cours-1-Les-cultures-cellulaires.pdf>.
- <https://www.santelog.com/actualites/therapie-cellulaire-des-cellules-cyborg-programmables-et-controlables>.
- <https://presse.inserm.fr/de-la-pluripotence-a-la-totipotence/20082/>.